

特集 《2025 大阪・関西万博（第2弾）》

# DNA origami を用いた人工酵素の開発とその検査応用

Cranebio 株式会社 CTO 齋藤 敬太



## 要約

PCR 検査は高い精度を有している一方で、装置が必要であることから、運用上の様々な制約が存在している。当社では DNA origami 法と呼ばれる DNA ナノテクノロジーを用いて、EC サイトで購入可能な検査キットというコンセプトを目指し、核酸検査のデバイスレス化に取り組んでいる。本稿では、DNA origami が「微細構造を精度良く構築可能」であり、「特定の分子の存在下、構造が変化する」という技術的特徴を活かして開発した人工酵素 Dozyme の紹介と、Dozyme を用いたアプリケーションについて、一部紹介する。なお、これらの技術は、2025 年大阪・関西万博大阪ヘルスケアパビリオン「展示・出展ゾーン」にて紹介される予定である。

## 目次

- はじめに
- 開発背景
  - 事業背景について—核酸検査のホームテスト化—
  - 技術背景について
  - DNA origami の特徴とその応用
- Dozyme を用いたアプリケーションの開発
  - ヒトパピローマウイルス (HPV) 検査
  - 大腸菌検査
- おわりに

## 1. はじめに

2006 年にカリフォルニア工科大学の P. Rothemund より最初に DNA origami が報告されて以来<sup>(1)</sup>、DNA origami の特徴を活かし、学術的には世界中で様々な実用化を目指した取り組みの報告<sup>(2)</sup>自体はあるものの、産業としては黎明期を抜け出せていない印象である。当社では、今後起きると想定している核酸検査のホームテスト化の中で鍵になるテクノロジーとして注目しており、積極的に研究開発を進めている。

本稿では、DNA origami 技術について当社が着目した特徴と、その特徴を活かした検査応用について述べる。

## 2. 開発背景

### 2. 1 事業背景について—核酸検査のホームテスト化—

技術的な話題に入る前に、当社の見据える未来である「核酸検査のホームテスト化」について触れておきたい。本稿をご覧の方はご存知の通り、核酸検査は PCR 法に代表される DNA 増幅手法を用い、サンプル中極めて微量に含まれる核酸を増幅することでサンプル中の DNA を検出する手法であり、その市場規模はグローバルで 2023 年度 1.3 兆円、2032 年 2.7 兆円とポストコロナにおいても高い成長率が見込まれている<sup>(3)</sup>。

その中でも大きな比重を占めているのが菌やウイルス検出のアプリケーションである。菌やウイルスを検出する場合はタンパク質測定法と培養法と比較されることが多いが、どちらの手法に対しても明確なメリットがあり、使

い分けられている。タンパク質測定法との比較で言えば、感度に優れ、新型コロナウイルスのような新種の菌やウイルスに対しても迅速に検査手法を確立することが可能である<sup>(4)</sup>。また、培養法との比較で言えば、極めて早い時間で結果を得ることができ、感度も培養法と近いレベルで検査が可能である<sup>(5)</sup>。

一方でPCR検査のデメリットを考えると、感度で劣るイムノクロマト法抗原検査が今も新型コロナウイルスの検査で広く行われていることから、PCR検査は「あらゆる場所で広く行う」という点において扱いづらさがある<sup>(4)</sup>。一つ目は、測定に専用の装置が必要な点である。専用の装置が必要である以上、測定する際に測定検体は装置のある場所まで郵送される必要があり、測定自体は数時間で終わるにも関わらず、結果を返すには数日を要するケースが多い。加えて、装置代の初期費用が発生するため、導入される場所は投資回収の確度が高い場所に限定されてしまう。二つ目は測定環境自体を作る必要がある点である。安定的に測定するためには増幅産物による作業環境汚染を防ぐ取り組みが必要であるが、例えばタカラバイオ社より公開されている「PCR実験でDNAコンタミネーションを防ぐための7つのヒント」では2つの部屋に2つのクリーンベンチの他に安全キャビネットのある作業環境を推奨している<sup>(6)</sup>。DNA増幅後のサンプルを開封せずに廃棄可能な全自動タイプであればここまでの測定環境は不要とも考えられるが、程度問題こそあれ、測定環境の管理は正しい結果を得るためには必要である。最後に、これらの制限が発生する以上、必然的に「専門の測定者」が必要となってくる。すなわち、初期費用だけでなく、測定者の人件費に纏わるランニングコストも決して小さくなく、結果、他の手法と比較して検査費用が高額になりがちである。

これらの欠点を解消するために、米国を中心に核酸検査のポータブル化がなされてきた。上市されているポータブルな検査キットは初期費用を大幅に抑えることが期待でき、操作も簡便である。このポータブルデバイスを用い、Visby medicalはユニコーン企業として大きな存在感を發揮している<sup>(7)(8)</sup>。これは大型の装置と比較すると大きな進歩であると言えるが、装置がある以上装置を置いておく場所が必要であり、PCR法と同様に検体が装置の置いてある場所に赴く必要があるか、送り返すなどの煩雑さが発生する。Visby Medicalはこの点を使い捨てにすることで克服しているが、コスト増は避けることが出来ず、価格帯は数万円である<sup>(7)</sup>。(ただし、それでも郵送PCR検査よりは安価である。)

そこで当社はPCR検査-より広くは核酸検査-をデバイスレス化し、最終的にスマートフォンでの検出を目指し、開発を行っている。デバイスレス化すれば、最終的にはECサイトより購入が可能になり、検査キットが測定者のところに郵送される未来が可能となる。測定環境も同一の場所で何度も測らなくなるので、汚染のリスクも低減する。操作が十分簡単であれば、専用の作業者は不要となり、人件費分のコストも削減可能である。このような資本集約型ビジネスモデルを可能とする検査キットは小売/物流業界のデジタル化とも非常に相性が良いため、将来的に大きく発展すると考えられる(図1)。

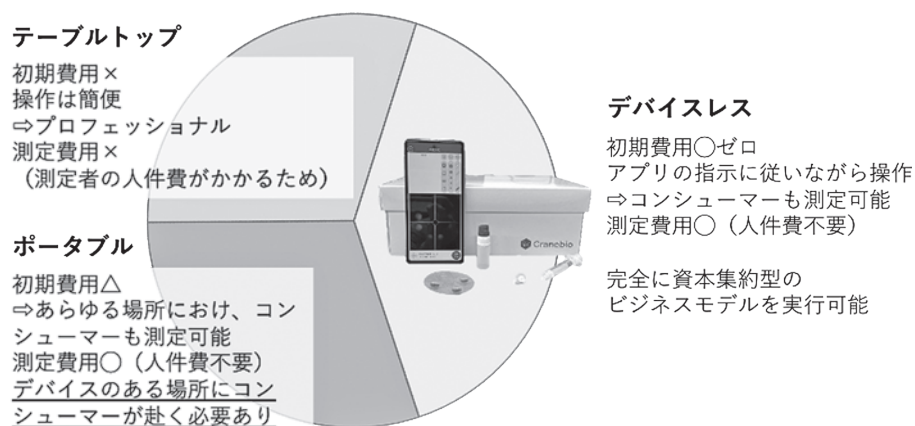


図1 テーブルトップ型、ポータブル型とデバイスレス型のビジネスモデル比較

## 2. 2 技術背景について

PCR検査のデバイスレス化には大きく2つのハードルが存在する。1つ目は増幅に90℃近い加温が必要である

点である。これは PCR 法を用いている以上は避けて通れず、加温装置が必要不可欠となってしまう。一方、室温に近い温度域での等温増幅法として TRC 法や RPA 法が知られており、特に RPA 法は世界中で多くの論文が報告されていることから、工夫次第ではあるが、デバイスレス化は無理ではない<sup>(9)</sup>。もう 1 つのハードルが検出に関する部分である。現在最も広く用いられている検出技術は蛍光検出であり、励起光源を必要とするため、これもデバイスレス化には向かない。ホームテスト化を行うとすると、複雑な操作は出来ないため、「混ぜるだけでドミノ反応が生じ、結果、配列特異的に発色／発光する機構」が必要である。そこで当社は、DNA origami と呼ばれる DNA ナノテクノロジーを用いて、検出の課題にフォーカス、「混ぜるだけで増幅産物と配列特異的に発色／発光する機構」の構築を目指すこととした。

### 2. 3 DNA origami の特徴とその応用

DNA origami は P. Rothemund により 2006 年に報告された DNA ナノテクノロジーの一種である<sup>(1)</sup>。DNA origami は 7000bp を超えるウイルス由来の巨大 DNA をステーブルと呼ばれる 20-40bp 程度の短い DNA で折りたたむことで、特定のナノ構造を構築することのできる技術である。また、作成も非常に簡単で、巨大 DNA とステーブルを混合、加熱した後に徐冷するだけで良く、ステーブルの配列と組み合わせ次第で、様々な形状の DNA ナノ構造体を作り分けることが可能である (図 2)。また、特定の条件化において構造を変化させることも可能であり、「ナノロボット」と名の付く研究も多く報告されている<sup>(2)</sup>。ここで特定の条件というものは、特定のタンパク質や小分子、特定の配列の核酸の存在下のことを指し、DNA origami に認識したい分子への結合部位を搭載することで、この構造変化を引き起こすことが可能となる。

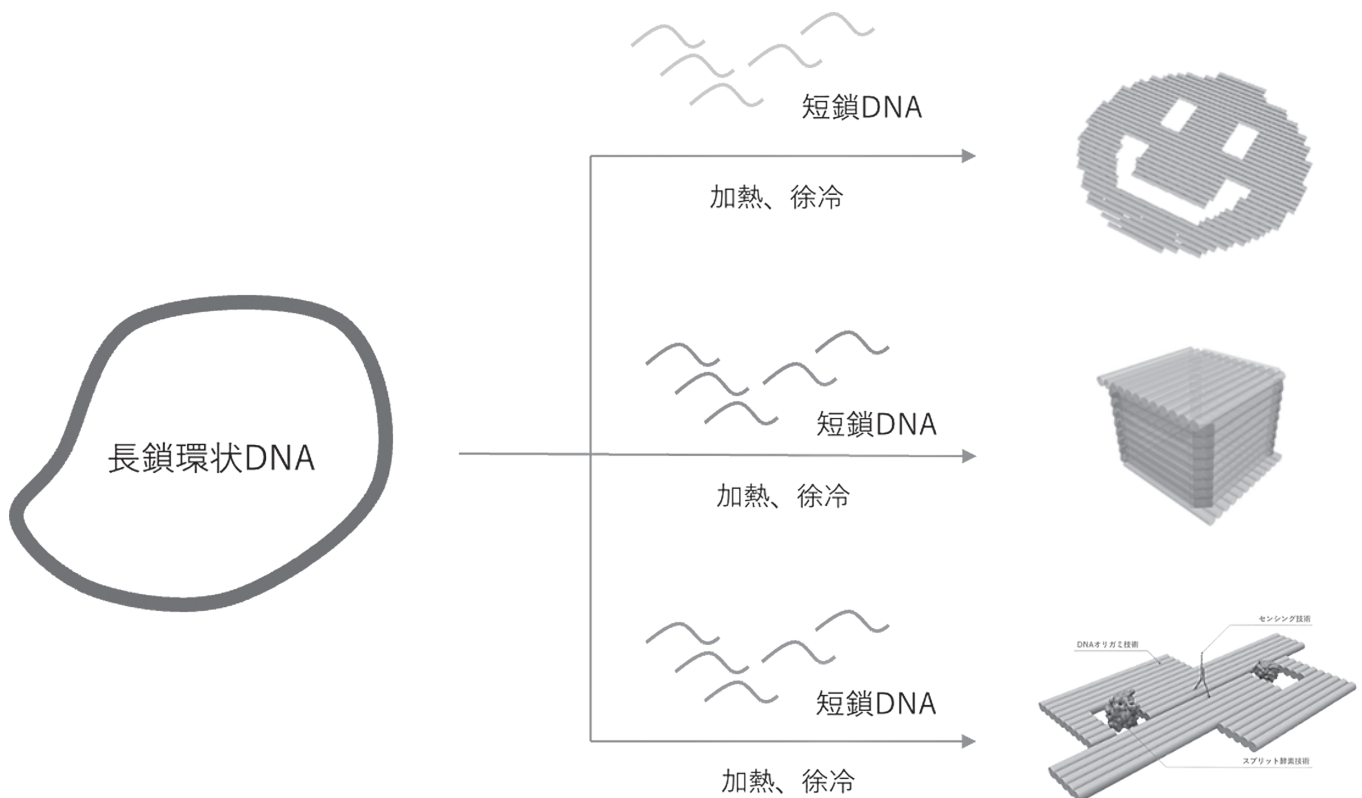


図 2 DNA Origami のコンセプトとバリエーション

当社で注目したのはこの「特定の分子の存在下、構造が変化する」という性質である。「特定の分子の存在下」を菌／ウイルスの DNA や RNA またはその増幅産物とすれば、後は「構造の変化」を人間の目やスマートフォンで検知可能な一工夫を加えれば良いことになる。

当社ではこの一工夫としてスプリット酵素に着目した。スプリット酵素は元々一つの機能を有するタンパク質を複数のフラグメントに分割することで、タンパク質の機能を一時的に消失させるが、何らかの理由で分割されたフラグメントが近傍に接近することで元々有していたタンパク質の機能を回復させることができるというものであ



り、細胞内におけるタンパク質間相互作用の研究などに用いられている<sup>(10)</sup>。このスプリット酵素を DNA origami に搭載し、特定の分子の存在下、DNA origami の構造変化に合わせてスプリット酵素のフラグメント間の距離が変化、近接し、酵素活性が復活するという仕組みを構築、人工酵素 Dozyme と命名した (図3)。Dozyme は通常時アンチパラレル型をとるが、これはスプリット酵素フラグメントが遠隔に配置されている構造であるため、不活性型である。しかし、構造変化を引き起こす化合物が存在している場合 (図3ではターゲット RNA) は、構造がクロス型を経てパラレル型へと変化し、スプリット酵素フラグメントが近傍へと配置される。これによりターゲット分子の存在を酵素活性の ON/OFF と結びつけることが可能となる。

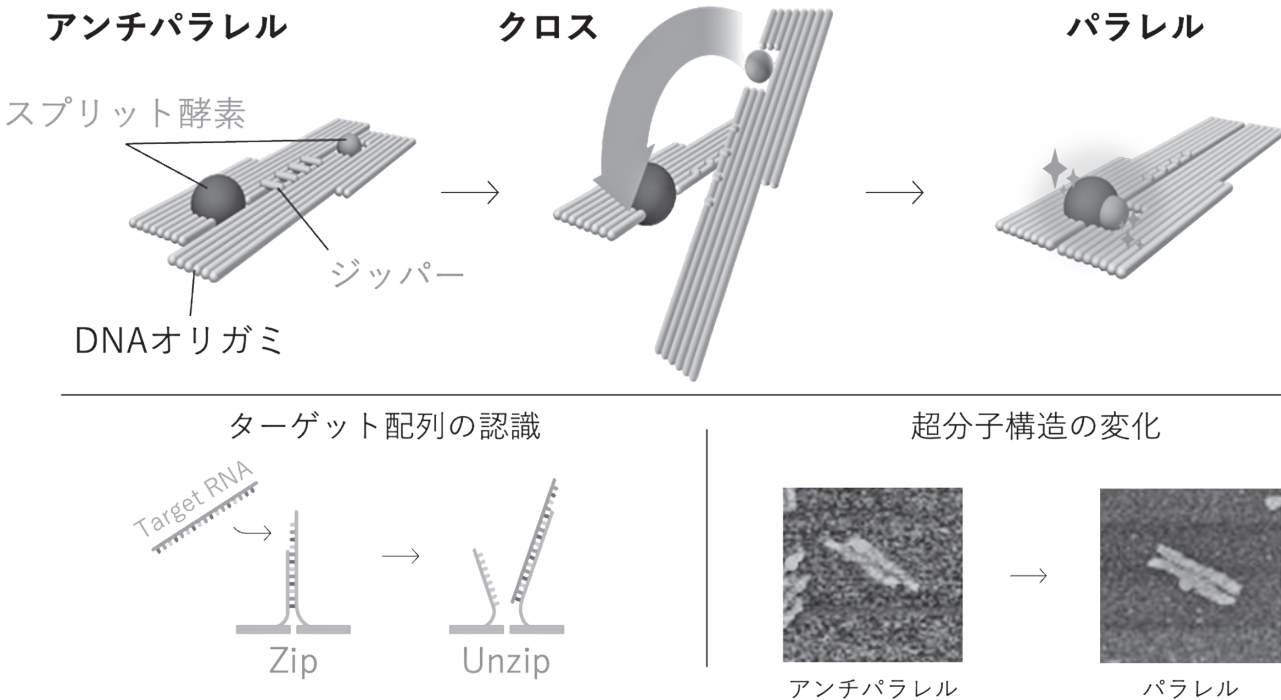


図3 Dozyme の活性化制御機構

Dozyme は、ニーズベースでは「菌/ウイルス由来の増幅産物を可視化する」という目的で開発されているものの、より広く Dozyme の特徴を解釈すると、特定の化合物と結合することで Dozyme に搭載された酵素活性の ON/OFF を切り替える人工酵素とすることができる。このような情報の変換はバイオセンシングにおいて重要であり<sup>(11)</sup>、様々なアプリケーションに繋がる可能性を秘めていると考えられており、特許化を行なった<sup>(12)</sup>。なお、これらの技術は、2025 年大阪・関西万博大阪ヘルスケアパビリオン「展示・出展ゾーン」にて紹介される予定である。

### 3. Dozyme を用いたアプリケーションの開発

#### 3. 1 ヒトパピローマウイルス (HPV) 検査

HPV は子宮頸がんや口腔がんなどを引き起こす可能性のあるウイルスである。特に子宮頸がんでは 80%-90% 以上の患者から HPV 感染が見られるとしており、全てのがん全体で見ても 4.5% が HPV によって引き起こされているとされている<sup>(13)</sup>。HPV には 16 型と 18 型に代表されるハイリスク型が存在しており、6/11/16/18/31/33/45/52/58 型に起因する子宮頸がんは全体の 90%、16 型と 18 型に限定しても全体の 71% を占める<sup>(13)</sup>。子宮頸がんは他のがんと同様早期に発見することが重要であり、5 年実測生存率はステージ I 期 93.4% と高い値を示すのに対し、ステージ IV 期では 25.6% まで低下する<sup>(14)</sup>。以上より、HPV 検査は子宮頸がんの早期スクリーニングの観点で非常に重要であり、米、英、豪など複数の国で HPV テスト単体または細胞診テストとの組み合わせによる子宮頸がん一次スクリーニングが実施されている<sup>(15)</sup>。

当社では実際に Dozyme を用いて HPV のセルフテストキットの開発を行なっている。現在開発中のプロトタイプではデバイスレスに  $10^2$  コピー/ $\mu\text{L}$  の HPV ウイルス DNA をスマートフォンの光で検出することに成功して

いる。Dozyme の特徴を活かし、電源を必要としない使い捨てのキットを用いた検査キットであるが、反応時間を除いた操作時間を全て足し合わせても 1 分半に満たない点もホームテストにおいてはアドバンテージになると考えている (図 4)。

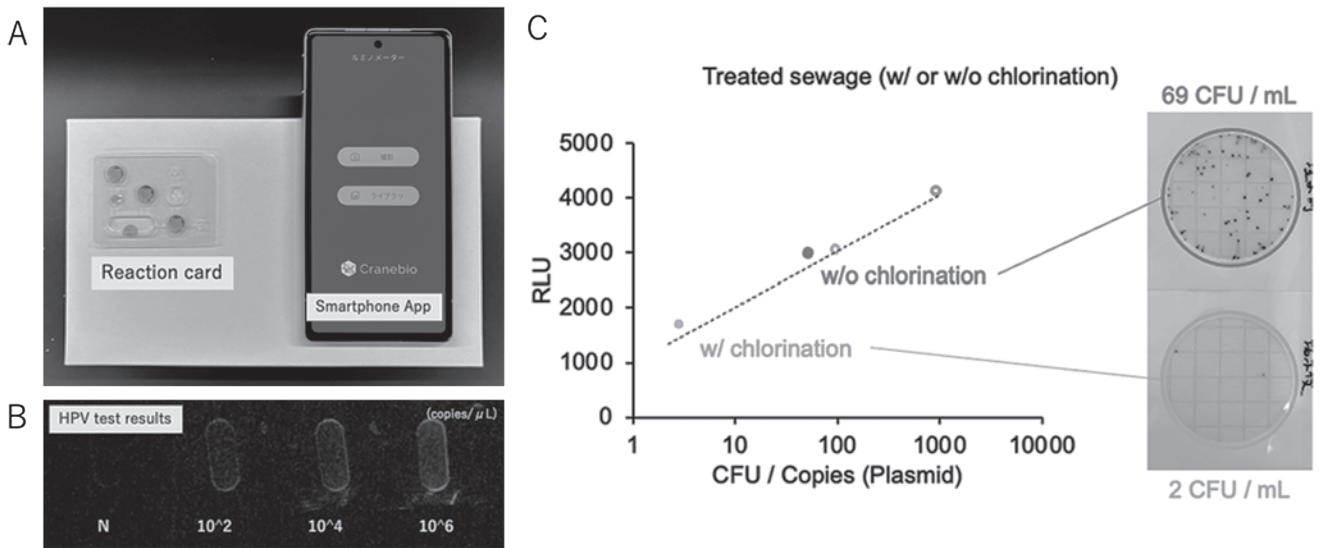


図 4 A) Dozyme を用いた検査キットの外観 B) HPV 検査キットをアプリで撮影した場合の画像 C) 大腸菌検査キットの培養法との比較

### 3. 2 大腸菌検査

大腸菌はグラム陰性菌の一種であり、環境中に多く生息している菌である。大腸菌の検査は医療領域においては尿路感染症、髄膜炎、敗血症などの検査で行われることが多いが、環境分析においては糞便汚染の指標として用いられ、河川の清浄度、上下水道の殺菌指標の他、医薬品、飲食品工場における環境分析や加工品の分析の際の指標でもある。上述の用途で測定を行う際には簡便性の観点や過去に実施されてきた実績も併せて培養法が広く用いられているものの、培養法は結果を得られるためには時間がかかる (検査センターに郵送するために必要な時間とは別に 24 時間 -72 時間) ため、例えば食品業界では出荷後に結果が得られることとなり、多額の資金を投じリコールをする必要が生じる<sup>(16)</sup>。このリスクを回避するために PCR 法を用いた大腸菌分析が欧米を中心に広がりを見せており、近い将来フードセーフティ (食品の安全管理) の半数以上が PCR 法にとって代わるとの見方もある<sup>(17)</sup>。だが一方で、食品業界は検査コストに関するコスト感はかなりシビアであり、PCR 法は高額であるため、現状では未だに培養法が広く用いられている。

上下水道においても現状培養法が用いられているという点においては、同様の状況であるが、管理指標としての意味合いは、場所や用途によって大きく異なる。途上国においてはやはり飲料用水のニーズが大きく、例えばインドのシリコンバレーとして知られるバンガロールですら、近郊の飲料用水から 1,000CFU/100ml を超える基準の大腸菌が検出される (WHO 基準では検出されないこととされている<sup>(18)</sup>) など、日本とは異なる衛生環境の場所はまだまだ多い<sup>(19)</sup>。

日本の状況にフォーカスすると、2つの異なるニーズが上下水道の整備の採算が取れない島嶼地域や一部の過疎地域などは簡易水道などで対応することが多いため、簡易水道における浄水機能の定期的なモニタリングが要求されているものの、現地での採水から結果を返すまでの手間は決して小さくはない。

また、近年の下水道業界で話題になっているのが下水道中の大腸菌数の測定である<sup>(20)</sup>。これは令和 7 年 4 月 1 日に水質汚濁防止法の改正により、下水処理場からの排出基準が大腸菌群から大腸菌へと代わり、その基準が 800CFU/100mL に設定されたことによる。培養法においては定量的測定方法の場合、コロニーカウントの人的費がかかることなどから測定費用が高くなる傾向にあり、安い測定方法が求められている状況にある。

上述のように様々な応用が可能であることから、当社でも Dozyme の大腸菌検出への応用を行った (図 4)。図

4C 中波線は、養した大腸菌液の段階希釈を行い、培養法と Dozyme 法と 2 種類の測定法によって検出した結果である。培養法と Dozyme 法との間に高い直線性が認められた。加えて、下水処理水の測定を行った。測定に用いた下水処理水はある下水処理場の最終工程である塩素添加前と塩素添加後の河川に放流する状態のものである。先ほどの培養した大腸菌の場合の結果と同様に、下水処理水も培養法と Dozyme 法の 2 種類の測定を行った結果、先ほどの培養した大腸菌にて得られた直線と高い相関性が見てとれる結果となった。加えて、本結果から現在の下水処理場の高い処理能力により、少なくとも今回測定したサンプルにおいては、河川放流前に塩素処理を行わずとも基準を十分満たしていることが見てとれる。今後、放流前のリアルタイム測定により、塩素添加をする必要がなくなれば、塩素のコストも下がり、環境負荷も低減できる可能性がある。

#### 4. おわりに

ここまで当社の開発コンセプトとコア技術である DNA origami を用いた人工酵素 Dozyme をご紹介させていただいた。DNA origami は未だ発展途上の技術であり、研究者のアイデアひとつで様々な機能の付与、アプリケーションの開発が可能である。今後も多くのアイデアが生まれ、本分野の発展がより良い社会の実現に寄与することを願っている。

#### (参考文献)

- (1) Paul W.K.Rothmund, Nature, vol440, No.7082, pp297-302
- (2) Pengfei Zhan, Andreas Peil, Qiao Jiang *et al.*, Chemical Reviews, vol123, Issue 7, pp3325-4184
- (3) Fortune business insights 社「ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 市場規模、シェアおよび業界分析、タイプ別 (標準 PCR、リアルタイム PCR、およびデジタル PCR)、製品別 (機器および試薬および消耗品)、適応症別 (感染症、腫瘍学、遺伝性疾患)、その他)、エンドユーザー別 (病院および診療所、製薬およびバイオテクノロジー産業、診断センター、学術および研究機関)、および地域予測、2024~2032 年」
- (4) 病原体検査の指針検討委員会「新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 病原体検査の指針 (第 4 版)」
- (5) 熊谷 遼太、長島 真美、浅倉 弘幸他、東京健安研七年報、vol71、先行公開版
- (6) タカラバイオ社ホームページより [https://blog.takara-bio.co.jp/qPCR/PCR\\_tips](https://blog.takara-bio.co.jp/qPCR/PCR_tips)
- (7) Visby Medical 社ホームページより <https://www.visbymedical.com/>
- (8) Visby Medical 社プレスリリースより  
<https://www.visbymedical.com/news/visby-medical-raises-over-100-million-in-series-e-financing/>
- (9) Jia Li, Joanne Macdonald and Felix von Stetten, Analyst, vol144, No.17, pp31-67
- (10) Shion A Lim, James A Wells, Methods Enzymol., vol644, pp275-296
- (11) 技術戦略研究センターレポート「TSC Foresight, vol23」より <https://www.nedo.go.jp/content/100870193.pdf>
- (12) WO2022030378A1
- (13) Catherine de Martel, Martyn Plummer, Jerome Vignat and Silvia Franceschi, Int J Cancer, vol141, No.4, pp664-670
- (14) 国立がん研究センター がん対策研究所「子宮頸がんのその他のヒトパピローマウイルス (HPV) 関連がんの予防」
- (15) National Cancer Institute 「Cervical Cancer Screening」 <https://www.cancer.gov/types/cervical/screening>  
National Health Service 「What is cervical screening?」 <https://www.nhs.uk/conditions/cervical-screening/what-is-cervical-screening/>  
Australian Institute of Health and Welfare 「National Cervical Screening Program monitoring report 2021」  
<https://www.aihw.gov.au/reports/cancer-screening/national-cervical-screening-program-monitoring-rep/summary>
- (16) 厚生労働省「食品、添加物等の規格基準 (昭和 34 年厚生省告示第 370 号)」
- (17) 矢野経済研究所「< 2021 年版 > 食品分析サービス・検査キットの市場実態と将来展望」
- (18) 国立保健医療科学院「WHO 飲料水水質ガイドライン第 4 版」
- (19) G. Sheeba, Anjaneyulu Jalagam and Padma Venkatasubramanian, Current Science, vol113, NO.9, pp1702-1709
- (20) 環境省「水質汚濁防止法施行規則等の一部を改正する省令の公布について」

(原稿受領 2024.10.23)